

Patentansprüche

1. Verbindungen von Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV), welche Verbindungen die allgemeine Formel A-B-C aufweisen, wobei

A eine Aminosäure

B die chemische Bindung zwischen A und C oder eine Aminosäure, und

C ein instabiler Inhibitor von DP IV nämlich ein Dipeptidyl-Alkylketon-Derivat, wobei ein Fluoralkylketon-Derivat als Dipeptidyl-Alkylketon-Derivat ausgenommen ist, ein Dipeptidylchloralkylketon-, ein Dipeptidylcyanid- oder ein Dipetidylpyridiniummethylketonrest ist.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B Prolin, Hydroxyprolin, Thiazolidincarbonsäure, Dehydroprolin, Pipecolinsäure, Azetidincarbonsäure oder Aziridincarbonsäure ist.

3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß B Prolin oder Hydroxyprolin ist.

4. Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Dipeptidgruppe Ile-Thia, Ile-Pyr, Val-Thia oder Val-Pyr ist.

5. Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Inhibitoren in Salzform vorliegen.

6. Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Inhibitoren als organische Salze wie Acetate, Succinate, Tartrate oder Fumarate oder anorganische Säurereste wie Phosphate oder Sulfate vorliegen.

7. Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß A-B ein Dipeptid der Formel Ile-Pro oder Gly-Pro ist.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung insbesondere zur oralen Verabreichung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche gegebenenfalls in Kombination mit üblichen Trägern oder Hilfsstoffen enthält.

9. Verwendung von Verbindungen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen nach einem der vorstehenden Ansprüche zur Herstellung eines Medikaments zur zeitlich gesteuerten in vivo Inhibierung von DP IV.

10. Verwendung von Verbindungen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur zell-, gewebs- oder organspezifischen Inhibierung von DP IV.

11. Verwendung von Verbindungen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Behandlung von Erkrankungen von Säugern, die durch Modulation der DP IV-Aktivität eines Säugers behandelt werden können.

12. Verwendung nach Anspruch 10 zur Behandlung von Stoffwechselkrankungen von Menschen.

13. Verwendung nach Anspruch 10 zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

DEUTSCHE
PATENT-
UND
MARKEN-
OFFICE

Verbindungen von instabilen DP IV-Inhibitoren

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen von instabilen Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV), welche Verbindungen die allgemeine Formel A-B-C aufweisen, wobei

A eine Aminosäure

B die chemische Bindung zwischen A und C oder eine Aminosäure, und

C ein instabiler Inhibitor von DP IV ist.

Es ist bekannt, daß Aminoacyl Thiazolidide, Aminoacyl Pyrrolidide, N-Dipeptidyl, O-Acyl Hydroxylamine und andere Verbindungen als Inhibitoren des Serumenzyms Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) und analoger Enzyme wirken [vgl. DEMUTH, H.-U., J. Enzyme Inhibition 3, 249 (1990); DEMUTH, H.-U., HEINS, J., in *Dipeptidyl Peptidase IV* (B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1995, 1-37].

Es wurde gefunden, daß mittels stabiler Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV die T-Zell-vermittelte Immunantwort z. B. bei Transplantationen beeinflußt wird [vergl. KOROM, S., DEMEESTER, I., STADLBAUER, T.H.W., CHANDRAKER, A., SCHAUB, M., SAYEGH, M.H., BELYAEV, A., HAEMERS, A., SCHARPE, S., KUPIEC-WEGLINSKI, J.W., Inhibition of CD26/dipeptidyl peptidase IV activity in vivo prolongs cardiac allograft survival in rat recipients, Transplantation 63, 1495 (1997)]. Weiter kann rheumatische Arthritis [vergl. TANAKA, S., MURAKAMI, T., HORIKAWA, H., SUGIURA, M., KAWASHIMA, K., SUGITA, T., Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Int. J. Immunopharmacol. 19, 15 (1997)] unterdrückt werden kann.

Es wurde weiter gefunden, daß durch Verabreichung von stabilen Inhibitoren (Effektoren) der DP IV bzw. DP IV-analoger Enzym-

aktivität im Blut eines Säugers, durch deren damit verbundene, temporäre Aktivitätsreduktion, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP₁₋₄₂) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1₇₋₃₆) (o.a. GLP-1₇₋₃₇ oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird. Die durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielte, erhöhte Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Incretine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Incretin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert u.a. die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht. Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des behandelten Organismus. Dadurch können mittels DP IV - Inhibitoren Stoffwechselanomalien wie Übergewicht, Glukosurie, Hyperlipidämie sowie mögliche schwere metabolische Azidosen, Diabetes mellitus, die eine Folge langerer, erhöhter Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden [vgl. DE 196 16 486].

Mit Hilfe von DP IV - Inhibitoren kann auch das Eindringen von HIV in CD 26 (DP IV) positive Zellen experimentell verhindert werden [vergl. WAKSELMAN, M., NGUYEN, C., MAZALEYRAT, J.-P., CALLEBAUT, C., KRUST, B., HOVANESSIAN, A.G., Inhibition of HIV-1 infection f CD 26+ but not CD26- cells by a potent cyclopeptidic inhibitor of the DPP IV activity of CD 26. Abstract P 44 of the 24th European Peptide Symposium 1996].

Weiterhin wurde festgestellt, daß DP IV neuroaktive Peptide wie Neuropeptid Y und CLIP in ihrer Aktivität modulieren kann [vergl. MENTLEIN, R., DAHMS, P., GRANDT, D., KRUGER, R., Pro-

teolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. *Regul. Pept.* 49, 133 (1993); WETZEL, W., WAGNER, T., VOGEL, D., DEMUTH, H.-U., BALSCHUN, D., Effects of the CLIP fragment ACTH 20-24 on the duration of REM sleep episodes. *Neuropeptides*, 31, 41 (1997)].

Diese vielseitigen Wirkungen von DP IV-Inhibitoren implizieren, daß sich ihre Wirkungen bei Anwendungen in einem bestimmten pathophysiologischen Zustand eines Gewebes auf andere, normale physiologische Zustände z.B. in anderen Organen auswirken können. Diese Auswirkungen können sowohl positive als auch negative Folgen für den Zielorganismus haben.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Effektoren von DP IV bereitzustellen, die in bestimmten Zielgeweben oder Zielorganen eine hohe Bioverfügbarkeit von DP IV Inhibitoren und eine genau definierte Wirkungsdauer aufweisen.

Es war insbesondere die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Inhibitoren von DP IV bereitzustellen, die bei einer hohen Bioverfügbarkeit eine kurze genau definierte Wirkungsdauer aufweisen.

Diese Aufgaben werden durch die Bereitstellung von Verbindungen von instabilen Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) gelöst, welche Verbindungen die allgemeine Formel A-B-C aufweisen, wobei

A eine Aminosäure

B die chemische Bindung zwischen A und C oder eine Aminosäure, und

C ein instabiler Inhibitor von DP IV ist.

Stellt B eine Bindung dar, so ist es insbesondere eine Peptidbindung; stellt B eine Aminosäure dar, so ist diese vorzugsweise über Peptidbindungen mit A und C verknüpft.

Erfindungsgemäß können diese Verbindungen als Inhibitoren von DP IV eingesetzt werden, wobei der Ort ihrer Wirkung, der Zeitpunkt des Wirkungseintritts und die Dauer der Wirkung genau definiert werden kann:

Bei ihrer Verabreichung werden die Verbindungen z.B. durch geeignete Enzyme gespalten und so die instabilen Inhibitoren "C" unter Abspaltung der Gruppen A-B freigesetzt. Die Freisetzung der Inhibitoren erfolgt dabei sowohl durch chemische als auch durch enzymatische Mechanismen. Beispielsweise dienen Esterasen, Proteasen und Peptidasen zur Wirkstoff-Freisetzung aus erfindungsgemäßen Verbindungen. Derartige Esterasen, Proteasen etc. sind z.B. in den WO 97/45117, US 5433955, US 5614379, US 5624894 offenbart.

Die freigesetzten instabilen Inhibitoren können dann mit der vor Ort vorliegenden DP IV in Wechselwirkung treten und sie inhibieren. In kausaler Folge wird dadurch z.B. ein verminderter Abbau der vorstehend bezeichneten insulinotropen Peptide erreicht und dadurch die Wirksamkeit von Insulin erhöht wird.

Die Verabreichung von instabilen Inhibitoren der DP IV an sich hat sich zur Inhibierung von DP IV als nachteilig erwiesen, da sie sich in vivo sehr schnell zersetzen und somit eine gleichmäßige Verteilung der Inhibitoren insbesondere im menschlichen Organismen unmöglich ist. Insbesondere bei oraler Verabreichung sind derartige Inhibitoren so labil, daß sie nahezu wirkungslos bleiben (?). Daher wurden bisher insbesondere zur Behandlung von Diabetes mellitus stabile Inhibitoren eingesetzt.

Überraschenderweise ist nun gefunden worden, daß instabile Inhibitoren "C" dadurch ausreichend stabilisiert werden können, daß sie als Gruppen der Formel A-B-C maskiert werden.

Diese Stabilisierung ist auch insofern überraschend, als eine Verbindung der Formel A-B-C, die eine Carbonylmethylpyridiniumgruppe aufweist, am Pyridiniumstickstoffatom positiv geladen ist. Dadurch wird über die Methylengruppe ein Elektronenzug auf die Gruppe ausgeübt, die nach Abspaltung des Restes A-B das aktive, nukleophile Reaktionszentrum des Inhibitors darstellt. Aufgrund der so bewirkten Aktivierung des Reaktionszentrums wäre zu erwarten gewesen, daß dessen Nukleophilie derart gesteigert würde, daß an der Verbindung A-B-C unspezifisch Nukleophile andocken und der Inhibitor inaktiviert wird. Überraschenderweise ist jedoch gefunden worden, daß eine derartige Inaktivierung der Inhibitoren nicht eintritt.

Um mittels DP IV-Inhibitoren in solche physiologischen Regelkreise einzugreifen, die nur eine kurzzeitige Beeinflussung des Zielenzyms DP IV erfordern, werden erfindungsgemäß z.B. Inhibitoren als Komponente C bereitgestellt, die nur eine kurze Wirkungsdauer aufweisen und nach definierbaren Halbwertszeiten in inhibitorisch inaktive chemische Verbindungen übergehen.

Beispielsweise reicht für die Verstärkung des Incretin-Effektes bei Diabetes mellitus eine Wirkungsdauer der Inhibitoren von wenigen Minuten aus, während z.B. die Suppression der DP IV-vermittelten Immunantwort bei Transplantationen eine langfristige Wirkung der Inhibitoren erfordert.

Die erfindungsgemäßen instabilen Inhibitoren zyklisieren nach ihrer Freisetzung z.B. zu einem Piperazinderivat und werden so inaktiviert. Diese Reaktion erfolgt spontan und ist auf den nukleophilen Angriff des N-terminalen Aminostickstoffs auf die

C-terminale Carbonylfunktion des Dipeptid-Derivates zurückzuführen und wird durch die insbesondere in Prolin-haltigen Peptiden erleichterte *cis-trans* Isomerisierung um die Aminosäure-Imidbindung erleichtert.

Darüber hinaus setzt dieser Zerfallsprozess erst dann ein, wenn die Verbindung das gewünschte Zielkompartiment, beispielsweise den Blutkreislauf erreicht und die gewünschte Wirkung entfaltet.

Diese Eigenschaften der erfindungsgemäßen Inhibitoren kann erfindungsgemäß zum Design von unterschiedlichen DP IV-Inhibitoren genutzt werden, um nach Freisetzung des DP IV-Inhibitors dessen nunmehr erwünschte, zeitlich definierte Deaktivierung durch intramolekulare Zyklisierung einzuleiten.

Insbesondere werden erfindungsgemäß Verbindungen bevorzugt, in denen C ein Dipeptidderivat mit einer aktiven Carbonylgruppe am C-Terminus darstellt. Vorzugsweise stellt C eine Dipeptidylchloralkylketon-, eine Dipeptidylboronsäure- oder eine Dipeptidylcyanidverbindung oder eine Dipeptidylpyridiniummethyleketoverbindung dar. Derartige Inhibitoren haben sich als besonders wirksame instabile DP IV-Inhibitoren herausgestellt. Als Beispiele der Dipeptidgruppe können z.B. Ile-Thia, Ile-Pyr, Val-Thia und Val-Pyr genannt werden.

Die Inhibitoren (Komponente C) können erfindungsgemäß auch in Salzform vorliegen, wobei organische Salze wie Acetate, Succinate, Tartrate oder Fumarate oder anorganische Säurereste wie Phosphate oder Sulfate bevorzugt werden. Besonders bevorzugt werden Fumarate (?).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Verbindungen eingesetzt, in denen B Prolin, Hydroxyprolin, Thiazolidincarbonsäure, Dehydroprolin,

Pipecolinsäure, Azetidincarbonsäure oder Aziridincarbonsäure ist, wobei Prolin und Hydroxyprolin besonders bevorzugt werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen dabei insbesondere auch den Vorteil auf, daß die Inhibitoren der DP IV je nach individuellem Bedarf der Patienten freigesetzt werden:

Trifft eine erfindungsgemäße Verbindung mit einem DP IV-Molekül in Wechselwirkung, so wird sie durch das Enzym in die Gruppen A-B und den Inhibitor C gespalten. Der Inhibitor C wird das DP IV-Molekül inhibieren, so daß es keine weiteren Verbindungen mehr aufspalten kann. Liegen weitere DP IV-Moleküle vor, so kommt es so lange zur Spaltung der Verbindungen (wenn eine ausreichende Menge an entsprechenden Verbindungen verabreicht wurde), bis das letzte DP IV-Molekül inhibiert ist. Die übrigen Verbindungen werden nicht zersetzt und stellen somit so lange ein Inhibitordepot dar, bis die Konzentration an DP IV-Molekülen wieder ansteigt oder Inhibitormoleküle von der DP IV verdrängt werden bzw. Inhibitormoleküle eliminiert oder inaktiviert werden und es wiederum zu einer Spaltung der erfindungsgemäßen Verbindungen und somit zu einer Freisetzung von Inhibitoren kommt.

Die Erfindung weist also den weiteren Vorteil auf, daß jeder Organismus genau die Menge an Inhibitor freisetzen wird, die zur Inhibierung der individuell in unterschiedlicher Menge vorliegenden DP IV notwendig ist. Liegt bei einem Patienten DP IV z.B. in hohen Konzentrationen vor, so wird eine große Menge an Inhibitor freigesetzt; liegt nur eine wenig erhöhte Konzentration an DP IV vor, so wird nur eine geringe Menge an Inhibitor freigesetzt.

Insbesondere werden Verbindungen bevorzugt, in denen A-B ein Dipeptid der Formel Ile-Pro oder Gly-Pro ist (?).

Die vorliegende Erfindung betrifft also neue Verbindungen von instabilen Inhibitoren der Serinpeptidase Dipeptidyl Peptidase IV, die zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen insbesondere von mit Diabetes mellitus im Zusammenhang stehenden Stoffwechselerkrankungen eingesetzt werden können.

Überraschenderweise weisen derartige maskierte Inhibitoren gegenüber nicht maskierten Inhibitoren zusätzlich eine erheblich gesteigerte Wirksamkeit auf: Werden identische Mengen von unmaskierten Inhibitoren der DP IV und von erfindungsgemäßen Verbindungen eingesetzt, so kommt es bei Wistaratten durch die erfindungsgemäßen Verbindungen zu einer deutlichen Glukosetoleranzverbesserung(?).

Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Verbindungen besteht darin, daß der Wirkungseintritt und auch die Wirkungsdauer der DP IV-Inhibitoren durch geeignete Auswahl der Gruppen A-B zeitlich gesteuert werden kann. Insbesondere hängt die Freisetzung der Gruppen A-B aus den erfindungsgemäßen Verbindungen von der Natur des Aminosäurerestes von A ab: Bezuglich der Definition der Gruppe A wurde insbesondere folgende Reihenfolge der Freisetzungsgeschwindigkeit der Reste A-B aus den Verbindungen A-B-C durch DP IV gefunden:

Ile<Val<Phe<Pro<Ala<Gly. Die Geschwindigkeitskonstanten der entsprechenden DP IV-katalysierten Freisetzungen liegen zwischen 1 s^{-1} und 100 s^{-1} . Damit steht ein Mittel zur Verfügung, die DP IV-Inhibitoren zeitlich exakt definiert freizusetzen: Soll die Wirkung der Enzyme sofort, z.B. bei Aufnahme Glukosereicher Nahrung eintreten, so wird eine Verbindung A-B-C gewählt, die als Gruppe A z.B. die Aminosäure Gly aufweist; soll erst eine verzögerte Wirkung des Inhibitors eintreten, so kann als Gruppe A z.B. die Aminosäure Ile ausgewählt werden. DP IV-Inhibitoren können durch die erfindungsgemäßen Verbindungen also insbesondere nahezu verzögerungsfrei, z.B. nahezu gleich-

zeitig mit aufgenommenen Nahrungsmitteln durch die Dünndarmmucosa transportiert werden.

Ferner kann auch der Freisetzungsort und Wirkungsort der DP IV-Inhibitoren durch die Art der Reste A-B gesteuert werden:

Im Blut von Säugern liegen neben der Dipeptidyl Peptidase IV verschiedene andere Aminopeptidasen wie z. B. Pyroglutamyl Aminopeptidase und Prolyl Aminopeptidase vor. Durch geeignete Auswahl der Reste A-B kann erfindungsgemäß festgelegt werden, durch welche Aminopeptidase der DP IV-Inhibitor freigesetzt werden soll und somit bestimmt werden, wo die Wirkung des Inhibitors eintreten soll. Die erfindungsgemäßen Verbindungen oder entsprechende pharmazeutische Zusammensetzungen können also auch zur zell-, gewebs- oder organspezifischen Inhibition von DP IV eingesetzt werden. Die Gruppen A-B können auch so ausgewählt werden, daß nur solche Enzyme angesprochen werden, die nur vaskulär präsent sind und die die Inhibitoren mit ausreichend hoher Geschwindigkeit freisetzen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß durch die erfindungsgemäßen Verbindungen von instabilen DP IV-Inhibitoren in völlig überraschender Weise:

1. Eine erhöhte Wirkung der Inhibitoren erreicht werden kann;
2. Die Freisetzung der Inhibitoren je nach Bedarf der Patienten erfolgen kann;
3. Die Freisetzung der Inhibitoren aus den Verbindungen zeitlich gesteuert erfolgen kann;
4. Die Freisetzung der Inhibitoren aus den Verbindungen bezüglich des Freisetzungsorts gesteuert werden kann;
5. Ein Depot von DP IV-Inhibitoren bereitgestellt werden kann; und

6. Die Wirkungsdauer bzw. das Wirkungsende der Initiatoren vom Zeitpunkt ihrer Demaskierung ab genau definiert werden kann.

Erfindungsgemäß werden außerdem pharmazeutische Zusammensetzungen insbesondere zur oralen Verabreichung bereitgestellt, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung gegebenenfalls in Kombination mit üblichen Trägern oder Hilfsstoffen enthält.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen oder sie enthaltende pharmazeutischen Zusammensetzungen können zur Behandlung oder Prophylaxe von Erkrankungen von Säugern eingesetzt werden, die durch Modulation der DP IV-Aktivität eines Säugers behandelt werden können, wie z.B. von Stoffwechselerkrankungen von Menschen.

Insbesondere können sie zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Neophropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern eingesetzt werden.

Durch die vorzugsweise kurze Wirkungsdauer der erfindungsgemäß instabilen Inhibitoren kann insbesondere eine Beeinflusung von Prozessen im menschlichen oder tierischen Körper minimiert oder verhindert werden, die eine langfristige Inhibition von DP IV vorraussetzen würden.

Ausführungsbeispiele

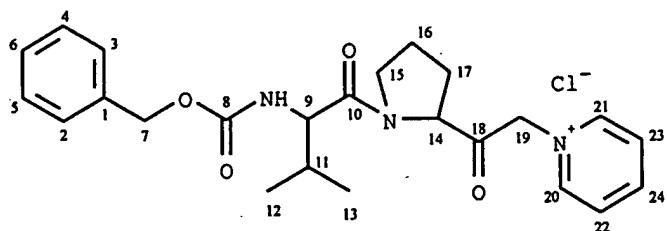
Synthese von instabilen DP IV-Inhibitoren C und erfindungsgemäßen Verbindungen instabiler DP IV-Inhibitoren (A-B-C)

Die Herstellung von instabilen DP IV-Inhibitoren C (entsprechend der allgemeinen Formel A-B-C) wird durch die Beispiele 1.1 und 1.2 belegt. Die Synthese einer erfindungsgemäßen Verbindung instabiler DP IV-Inhibitoren durch das Beispiel 1.3. Die Ausgangsverbindungen, die jeweils korrespondierenden Peptidylchloromethylketone, wurden nach bekannten Verfahren (WEINSTEIN, B., Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Marcel Dekker, New York, Basel, 1977) hergestellt. Die beispielhaft dargestellten Pyridiniummethylketone unter 1.1 und 1.2 sind als N-terminal geschützte Dipeptidderivate außerordentlich stabil und vollständig charakterisierbar. Die N-terminal deblockierten Dipeptidderivate beginnen bei normaler Luftfeuchte den intramolekularen Zersetzungsprozess unmittelbar nach Deblockierung, so daß keine Schmelzpunkte bestimmbar sind. Die Charakterisierung der Produkte erfolgt mittels HPLC und Massenspektrometrie.

1.1. Synthese von H-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) / Cl⁻

a) Z-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

10 mmol Z-Val-Pro-Chlormethylketon werden in Pyridin gelöst und bei 25 °C 5 Tage gerührt. Das überschüssige Pyridin wird bei

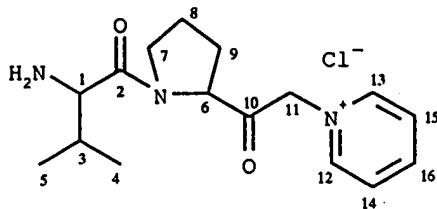
2 mbar Vakuum abdestilliert. Das Z-Val-Pro-Pyridiniummethylketon wird noch einer HPLC-Reinigung unterzogen. Die Verbindung ist ein Öl.

Summenformel: $C_{24}H_{30}N_3O_4Cl$
 Molmasse: 459.97 Da
 Ausbeute: 45.8 % d. Th.
 HPLC: Retentionszeit: 2.3 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4), $\lambda = 220$ nm, Flußrate 0.5 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0.1 % TFA)
 Retentionszeit: 19.3 min, Nucleosil 7 C₈, $\lambda = 220$ nm, Flußrate 8 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0.1 % TFA)
¹H-NMR (DMSO-d₆) δ_H : 0.8-1.0 (6H, m, H₁₂ u. H₁₃), 1.8-2.1 (3H, m, H₁₁ u. H₁₆), 2.2-2.4 (2H, m, H₁₇), 3.4-3.7 (2H, m, H₁₅), 3.7-4.1 (2H, m, H₂₀ u. H₂₁), 4.3-4.5 (1H, dd, 5 Hz, 8 Hz, H₉), 4.8-5.1 (2H, m, H₇), 5.8-6.2 (3H, m, H₁₄, H₁₉), 7.2-7.5 (5H, m, H₂-H₆), 8.2-8.3 (2H, m, H₂₂ u. H₂₃), 8.6-8.7 (1H, m, H₂₄), 8.8-9.0 (1H, d, 6 Hz, NH)
¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C : 136.8 (C₁), 127.9 (C₂, C₃), 127.8 (C₄, C₅), 128.4 (C₆), 66.7 (C₇), 156.3 (C₈), 57.9 (C₉), 170.8 (C₁₀), 29.7 (C₁₁), 18.5 (C₁₂, C₁₃), 63.7 (C₁₄), 47.2 (C₁₅), 25.1 (C₁₆), 27.9 (C₁₇), 200.3 (C₁₈), 71.1 (C₁₉), 146.1 (C₂₀, C₂₁), 128.3 (C₂₂, C₂₃), 146.4 (C₂₄)
 MALDI-TOF-MS m/z: 424.6 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)

b) H-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅)/Cl⁻

Strukturformel:

13



Darstellung:

Die Z-Schutzgruppe wird von Z-Val-Pro-CH₂- (N⁺C₅H₄) / Cl⁻ mittels HBr/eisessig in 5 minütiger Reaktionszeit abgespalten. 1.0 mmol Z-geschütztes Peptid versetzt man mit 2 ml HBr/Eisessig (33 %ig) und läßt es bei 23 °C ca. 10 min rühren. Anschließend wird im Vakuum eingeengt. Das Peptid wird als Hydrobromid mittels Diethylether aus Methanol gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Summenformel: C₁₆H₂₄N₃O₂Cl

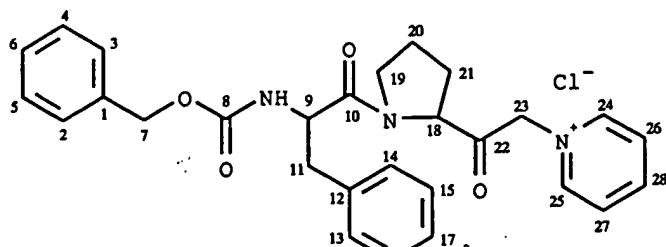
Molmasse: 325.84 Da

Ausbeute: 97.7 % d. Th.

HPLC: Retentionszeit: 7.4 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4), λ = 220 nm, Flußrate 0.5 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0.1 % TFA)

MALDI-TOF-MS m/z: 291.2 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)1.2. Synthese von H-Phe-Pro-CH₂- (N⁺C₅H₅) / Cl⁻a) Z-Phe-Pro-CH₂- (N⁺C₅H₅) / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung: 10 mmol Z-Phe-Pro-Chlormethylketon werden mit 2 ml Pyridin versetzt. Es wird 4 Tage bei 23 °C gerührt. Das überschüssige Pyridin wird bei 2 mbar Vakuum abdestilliert. Das Rohprodukt wird über 60 g Kieselgel gereinigt. Im Eluat Chloroform/Methanol wird anfangs (9:1 Vol.-Teile) das Produkt und mit zunehmender Polarität des Eluenten das Chlormethylketon aufgefangen. Z-Phe-Pro-Pyridiniummethylketon wird abschließend einer HPLC-Reinigung unterzogen.

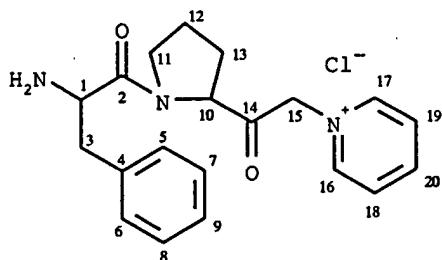
Summenformel: C₂₈H₃₀N₃O₄Cl
 Molmasse: 508.01 Da
 Ausbeute: 69.6 % d. Th.
 HPLC: Retentionszeit: 17 min, LiChrosorb RP 8 (Hibar), λ = 220 nm, Flußrate 8.0 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0.1 % TFA)
 Retentionszeit: 3.4 min, LiChrosper RP-8 (125*4),
 λ = 220 nm, Flußrate 1.5 ml/min, Gradient 30-80 % Acetonitril in H₂O (0.1 % TFA) in 25 min
 Retentionszeit: 10.2 min, Nucleosil 7 C₈, λ = 220 nm, Flußrate 8 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0.1 % TFA)
¹H-NMR (DMSO-d₆) δ _H: 1.7-2.1 (4H, m, H₂₀, H₂₁), 2.7-3.0 (2H, m, H₁₁), 3.4-3.9 (2H, m, H₁₉), 4.4-4.6 (1H, m, H₉), 4.6-4.8 (2H, m, H₂₄, H₂₅), 5.0-5.1 (2H, dd, H₇), 5.7-5.8 (1H, d, H₁₈), 5.9-6.1 (2H, dd, H₂₃), 7.2-7.4 (10H, m, H₂-H₆, H₁₃-H₁₇), 8.6-8.8 (1H, dd, H₂₈), 8.2-8.3 (2H, d, H₂₆ u. H₂₇), 8.8-8.9 (1H, d, NH)

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C: 136.8 (C₁), 127.9 (C₂, C₃), 127.6 (C₄, C₅), 128.4 (C₆), 65.5 (C₇), 156.3 (C₈), 54.1 (C₉), 170.9 (C₁₀), 36.4 (C₁₁), 137.6 (C₁₂), 126.6 (C₁₃, C₁₄), 128.4 (C₁₅, C₁₆), 129.3 (C₁₇), 63.1 (C₁₈), 46.9 (C₁₉), 25.1 (C₂₀), 27.6 (C₂₁), 200.7 (C₂₂), 66.3 (C₂₃), 146.2 (C₂₄, C₂₅), 128.2 (C₂₆, C₂₇), 146.4 (C₂₈)

MALDI-TOF-MS m/z: 472.8 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)

b) H-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

Die Z-Schutzgruppe wird von Z-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄) / Cl⁻ nach in 5 minütiger Reaktionszeit abgespalten. 1.0 mmol Z-geschütztes Peptid versetzt man mit 2 ml HBr/Eisessig (33 %ig) und lässt es bei 23 °C ca. 10 min röhren. Anschließend wird im Vakuum eingeengt. Das Peptid wird als Hydrobromid mit Diethylether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Summenformel:

C₂₀H₂₄N₃O₂Cl

Molmasse:

373.88 Da

Ausbeute:

98 % d. Th.

HPLC:

Retentionzeit: 6.9 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4), λ = 220 nm, Flußrate 0.5

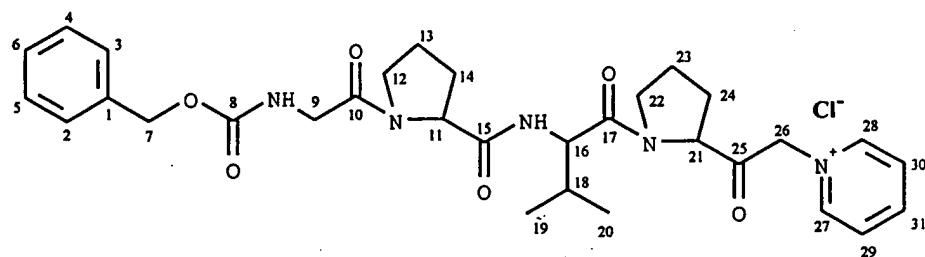
ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0.1 % TFA)

MALDI-TOF-MS m/z: 337.2 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)

1.3. Synthese von Z-Gly-Pro-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) / Cl⁻

a) Z-Gly-Pro-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung: 10 mmol Z-Gly-Pro-Val-Pro-Chlormethylketon werden mit 2 ml Pyridin versetzt. Es wird 4 Tage bei 23 °C gerührt. Das überschüssige Pyridin wird bei 2 mbar Vakuum abdestilliert. Z-Gly-Pro-Val-Pro-pyridinium-methylketon wird einer HPLC-Reinigung unterzogen.

Summenformel: C₃₁H₄₀N₅O₆Cl

Molmasse: 614.14 Da

HPLC: Retentionszeit: 17.4 min, LiChrosorb RP 8 Hibar, λ = 220 nm, Flußrate 8 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0.1 % TFA)

Retentionszeit: 5.4 min, LiChroCART 100 RP-18 (250-4), λ = 220 nm, Flußrate 0.5 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0.1 % TFA)

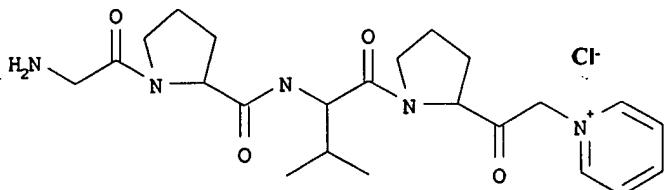
Retentionzeit: 17.7 min, Nucleosil 100 7 C₈, λ = 220 nm, Flußrate 5 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0.1 % TFA)

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ _C: 134.4 (C₁), 128.9 (C₂, C₃), 128.2 (C₄, C₅), 129.8 (C₆), 65.3 (C₇), 157.2 (C₈), 39.0 (C₉), 165.7 (C₁₀), 56.0 (C₁₁), 41.6 (C₁₂), 24.6 (C₁₃), 29.0 (C₁₄), 170.5 (C₁₅), 52.1 (C₁₆), 171.9 (C₁₇), 30.3 (C₁₈), 18.6, 19.3 (C₁₉, C₂₀), 58.9 (C₂₁), 47.2 (C₂₂), 25.0 (C₂₃), 29.4 (C₂₄), 196.5 (C₂₅), 65.8 (C₂₆), 137.9 (C₂₇, C₂₈), 129.1 (C₂₉, C₃₀), 146.5 (C₃₁)

MALDI-TOF-MS m/z: 579.7 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)

b) H-Gly-Pro-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

Die Z-Schutzgruppe wird von Z-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄) / Cl⁻ nach in 5 minütiger Reaktionszeit abgespalten. 1.0 mmol Z-geschütztes Peptid versetzt man mit 2 ml HBr/Eisessig (33 %ig) und läßt es bei 23 °C ca. 10 min rühren. Anschließend wird im Vakuum eingeengt. Das Peptid wird als Hydrobromid mit Diethylether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Summenformel:

C₂₃H₃₄N₅O₄Cl

Molmasse:

480,0 Da

Ausbeute:

95 % d. Th.

MALDI-TOF-MS m/z:

443,9 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)

1. Abbau instabiler DP IV-Inhibitoren und ihrer maskierten Formen in wässriger Lösung

Zur Analyse der Stabilität der unter 1.1 und 1.2 dargestellten Inhibitoren wurden diese in wässriger Pufferlösung inkubiert und ihre intramolekulare Zyklisierungsreaktion mit Hilfe von MALDI-TOF Massenspektrometrie verfolgt (Abbildungen 2 und 3). Die Produkte dieser Reaktion ergeben die jeweiligen Pyrazinderivate (Abbildung 1).

Der Abbau von H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon mit dem Molekulargewicht 337.2 Da vollzieht sich unter Wasserabspaltung zum zyklischen Pyrazinderivat mit dem Molekulargewicht 319.2 Da quantitativ innerhalb von 30 Minuten (Abbildung 2).

Der Abbau von H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon mit dem Molekulargewicht 291.2 Da vollzieht sich unter Wasserabspaltung zum zyklischen Pyrazinderivat mit dem Molekulargewicht 273.2 Da quantitativ innerhalb von 60 Minuten (Abbildung 3).

Die während der intramolekularen Reaktion erfolgende Ausbildung des Doppelbindungssystems des Pyrazins ermöglicht die quantitative Analyse des Zyklisierungsvorganges mittels UV-Spektrometrie (Abbildung 4). Die daraus ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die intramolekulare Zyklisierung der instabilen DP IV-Inhibitoren in 0.1 M HEPES-Puffer, pH = 7.6, 25° C, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Parameter der Zyklisierung instabiler DP IV-Inhibitoren

Verbindung	$k \text{ min}^{-1}$	Halbwertszeit
------------	----------------------	---------------

		(min)
H-Val-Pro-CH ₂ -(N ⁺ C ₅ H ₅)	8,7 * 10 ⁻⁴ (\pm 4 * 10 ⁻⁵)	13,3
H-Phe-Pro-CH ₂ -(N ⁺ C ₅ H ₅)	1,2 * 10 ⁻³ (\pm 3,9 * 10 ⁻⁵)	9,6

Im Gegensatz dazu erwiesen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen H-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) und H-Gly-Pro-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) über 24 Stunden unter gleichen Bedingungen als völlig stabil.

2. Wechselwirkung instabiler DP IV-Inhibitoren bzw. erfindungsgemäße Verbindungen mit Dipeptidyl Peptidase IV in wässriger Lösung

Inkubiert man das Targetenzym DP IV mit instabilen Inhibitoren in Gegenwart eines Substrates, so ist initial eine Hemmung des Enzyms zu beobachten, die durch die parallel verlaufende intramolekulare Zyklisierung des Inhibitors mit fortschreitender Versuchszeit wieder nachläßt, da die Konzentration des Inhibitors in der Reaktionslösung durch die spontan verlaufende chemische Reaktion abnimmt. Dieser Effekt ist in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt. Durch die zeitabhängige Konzentrationsabnahme des Inhibitors nimmt die Geschwindigkeit der enzymkatalysierten Hydrolyse des Substrates mit fortschreitender Zeit wieder zu.

Im Gegensatz zu den unmaskierten DP IV-Inhibitoren erweist sich die erfindungsgemäße Verbindung H-Gly-Pro-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) über 24 Stunden in gepufferter wässriger Lösung in Abwesenheit eines Enzyms als stabil. Erst durch die Zugabe des Enzyms DP IV (hier exemplarisch auch zur Freisetzung des DP IV-Inhibitors genutzt) wird unter Abspaltung des N-terminalen Dipeptides H-Gly-Pro-OH der aktive DP IV-Inhibitor H-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) freigesetzt. Im Massenspektrum (Abbildung 7) sind

demzufolge selbst nach 60 Minuten Inkubationszeit noch deutlich mehr als 50% der inkubierten erfindungsgemäßen Verbindung zu erkennen. Aufgrund dieser retardierten Freisetzung wird neben der gewünschten effektiven Inhibierung des Zielenzyms überraschenderweise auch eine deutlich verlängerte Wirksamkeit bei deutlich verminderter Konzentration der erfindungsgemäßen Verbindung gegenüber den instabilen DP IV-Inhibitoren beobachtet (Abbildung 8).

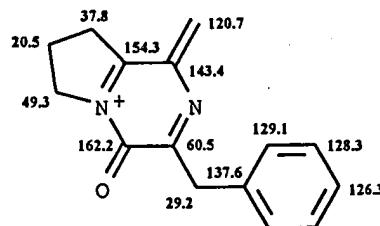
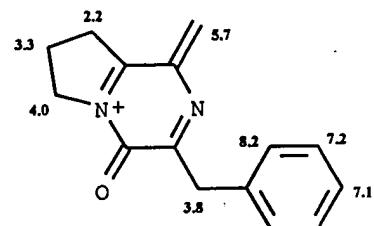
¹³C-NMR-Daten¹H-NMR-Daten

Abbildung 1: Strukturformel des Produktes der intramolekularen Zyklisierungs von H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon. Die charakteristischen chemischen Verschiebungen (in ppm) ermittelt mittels ¹³C-NMR- und ¹H-NMR sind den entsprechenden Atomen zugeordnet.

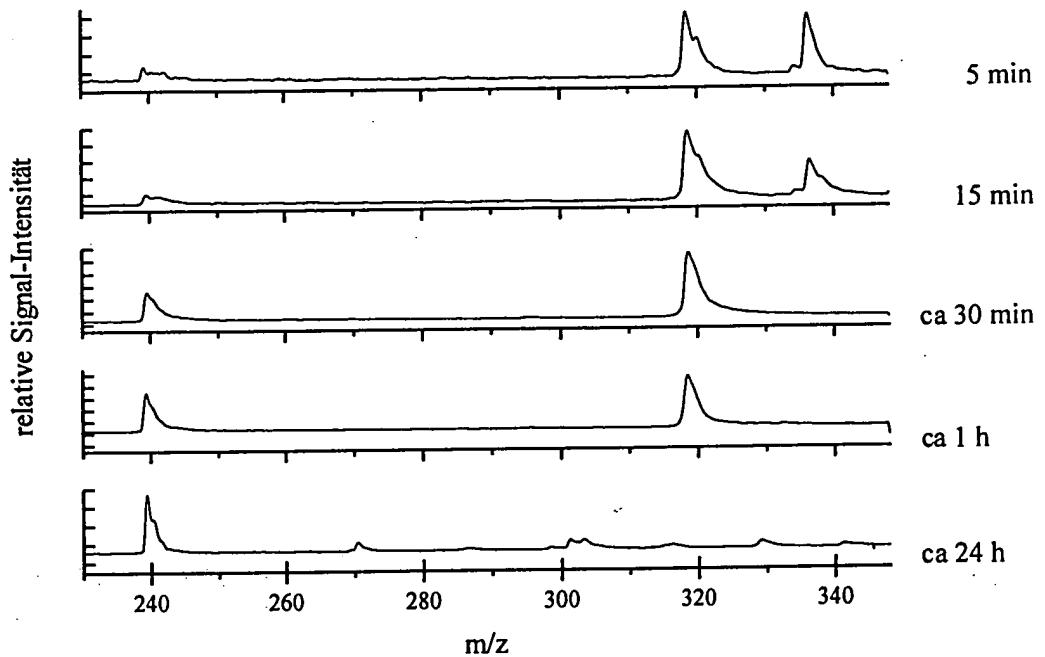


Abbildung 2: MALDI-TOF-Massenspektren der Zykлизierung von H-Phe-Pro-Pyridinium Methylketon in wässriger Pufferlösung pH = 7.6, aufgenommen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

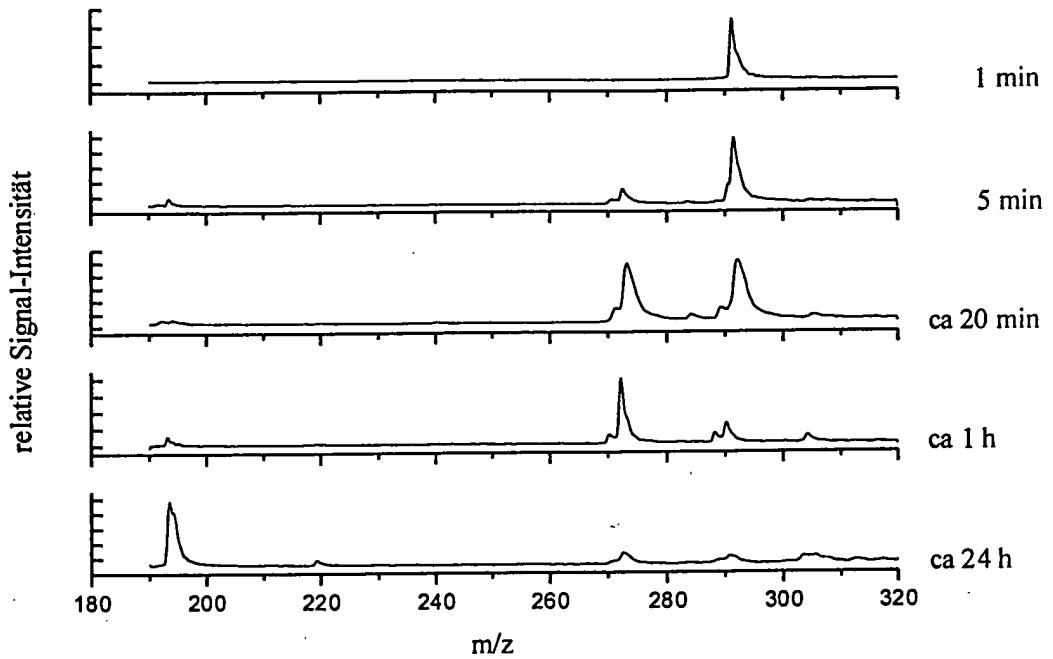


Abbildung 3: MALDI-TOF-Massenspektren der Zyklisierung von H-Val-Pro-Pyridinium Methylketon in wässriger Pufferlösung pH = 7.6, aufgenommen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

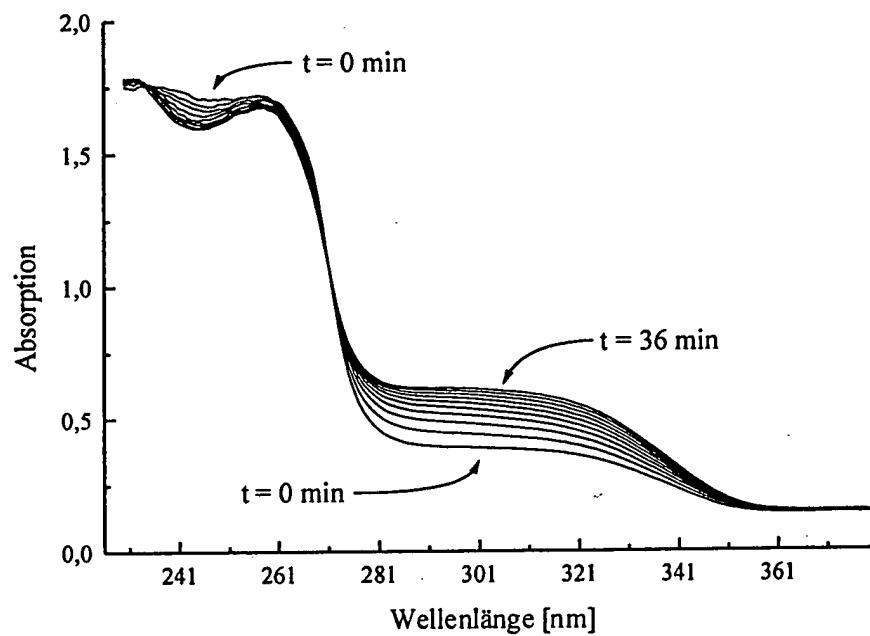


Abbildung 4: UV-Spektren einer wässrigen Lösung von H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon inkubiert in 0.1 M HEPES-Puffer, pH = 7.6, bei 30° C. Die Zyklierungsreaktion wurde innerhalb von 40 min verfolgt.

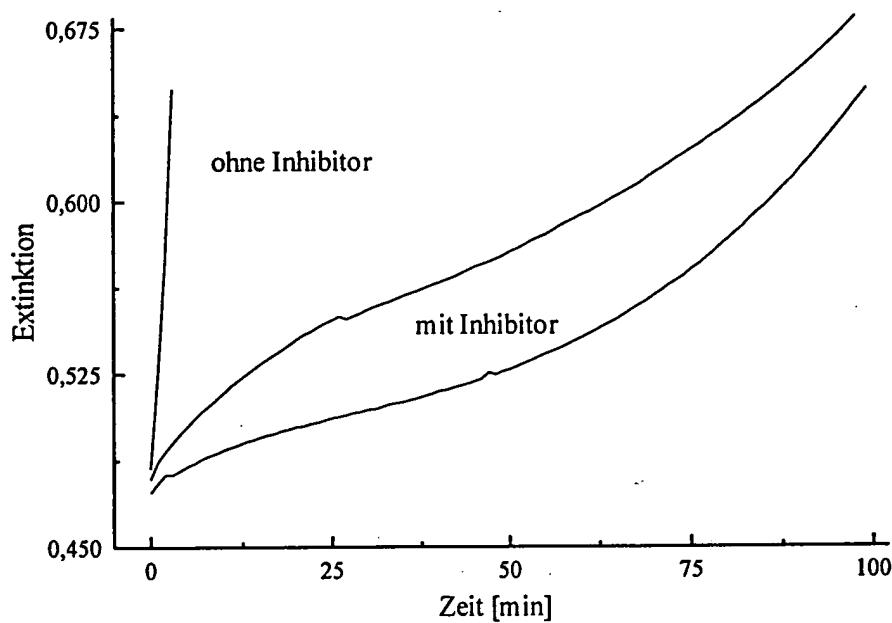


Abbildung 5: Progresskurven der DP IV-katalysierten Hydrolyse des Substrates H-Gly-Pro-*p*NA in Gegenwart von $2.8 \cdot 10^{-3}$ M H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon, 0.06 μ g/ml DP IV, $4 \cdot 10^{-4}$ M H-Gly-Pro-*p*NA im Ansatz, 0.1 M HEPES-Puffer, pH = 7.6, 30° C.

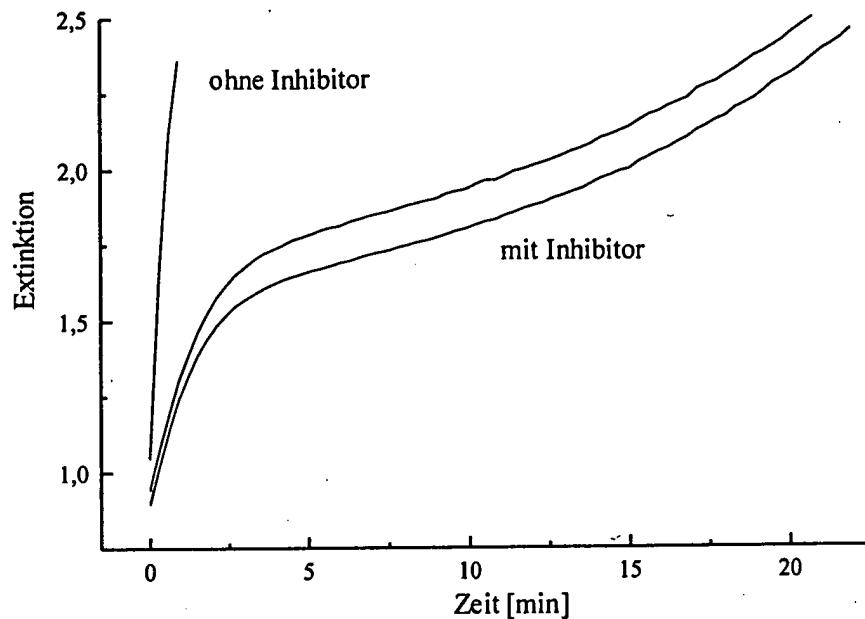


Abbildung 6: Progresskurven der DP IV-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-pNA in Gegenwart von $2.1 \cdot 10^{-4}$ M H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon, 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DP IV, $1.0 \cdot 10^{-3}$ mol/l H-Gly-Pro-pNA im Ansatz, 0.1 M HEPES-Puffer, $\text{pH} = 7.6$, 30°C .

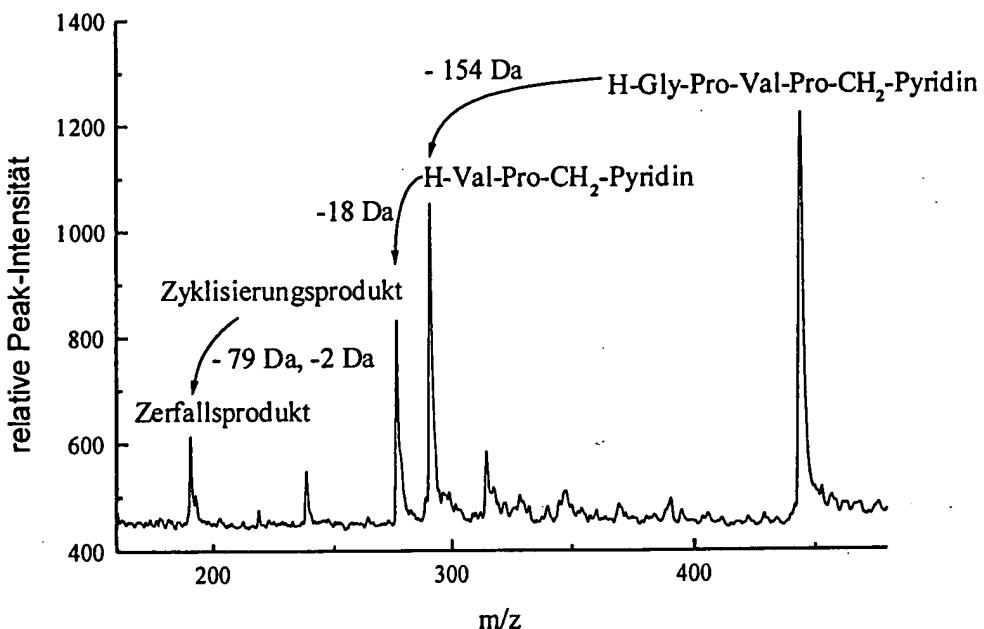


Abbildung 7: MALDI-TOF-Massenspektrum des Inkubationsansatzes der DP IV-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-*p*NA in Gegenwart von $2.6 \cdot 10^{-5}$ mol/l H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon, 0.06 μ g/ml DP IV, $2.0 \cdot 10^{-4}$ mol/l H-Gly-Pro-*p*NA, 0.1 M HEPES-Puffer, pH = 7.6, 30° C. Aufgenommen nach 60 min Inkubationszeit.

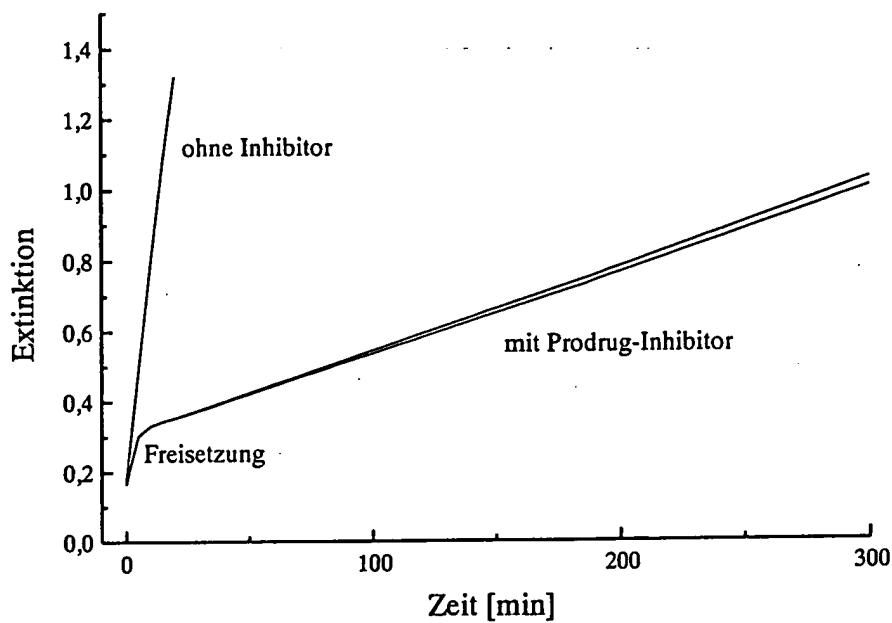


Abbildung 8: Progresskurven der DP IV-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-pNA in Gegenwart von $2.6 \cdot 10^{-5}$ mol/l H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon, 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DP IV, $2.0 \cdot 10^{-4}$ H-Gly-Pro-pNA mol/l im Ansatz, 0.1 M HEPES-Puffer, pH = 7.6, 30° C.

Patentansprüche

1. Verbindungen von Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV), welche Verbindungen die allgemeine Formel A-B-C aufweisen, wobei

A eine Aminosäure

B die chemische Bindung zwischen A und C oder eine Aminosäure, und

C ein instabiler Inhibitor von DP IV ist.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B Prolin, Hydroxyprolin, Thiazolidincarbonsäure, Dehydroprolin, Pipecolinsäure, Azetidincarbonsäure oder Aziridincarbonsäure ist.

3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß B Prolin oder Hydroxyprolin ist.

4. Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß C ein Dipeptidderivat ist, das am C-Terminus eine aktive Carbonylgruppe aufweist, wie ein Dipeptidyl-Alkylketon-Derivat.

5. Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß C ein Dipeptidylchloralkylketon-, eine Dipeptidylboronsäure-, ein Dipeptidylcyanid- oder ein Dipetidyl-pyridiniummethylketonrest ist.

6. Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Inhibitoren in Salzform vorliegen.

7. Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß A-B ein Dipeptid der Formel Ile-Pro oder Gly-Pro ist. (?)

8. Pharmazeutische Zusammensetzung insbesondere zur oralen Verabreichung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche gegebenenfalls in Kombination mit üblichen Trägern oder Hilfsstoffen enthält.

9. Verwendung von Verbindungen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen nach einem der vorstehenden Ansprüche zur Herstellung eines Medikaments zur zeitlich gesteuerten in vivo Inhibierung von DP IV.

10. Verwendung von Verbindungen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur zell-, gewebs- oder organspezifischen Inhibierung von DP IV.

11. Verwendung von Verbindungen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Behandlung von Erkrankungen von Säugern, die durch Modulation der DP IV-Aktivität eines Säugers behandelt werden können.

12. Verwendung nach Anspruch 10 zur Behandlung von Stoffwechselkrankungen von Menschen.

13. Verwendung nach Anspruch 10 zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen von instabilen Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV), welche Verbindungen die allgemeine Formel A-B-C aufweisen, wobei

A eine Aminosäure

B die chemische Bindung zwischen A und C oder eine Aminosäure, und

C ein instabiler Inhibitor von DP IV ist.

Derartige Verbindungen werden zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern verwendet.